

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-023885

(43)Date of publication of application : 28.01.1997

(51)Int.Cl.

C12N 15/09  
A61K 39/395  
C07H 21/04  
// C12P 21/02  
C12Q 1/68

(21)Application number : 07-176103

(71)Applicant : DAI ICHI SEIYAKU CO LTD

(22)Date of filing : 12.07.1995

(72)Inventor : FUJIWARA HIROYUKI  
NAKASUJI KIMIKICHI  
SATO YOSHIO

## (54) GENE EXPRESSION LIBRARY AND ITS PRODUCTION

### (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain the subject library capable of selecting useful substances by substituting a DNA to which a uniforming manipulation is performed in a cDNA clone containing a translation region of a protein for or inserting it into the part of a coat protein gene of a filamentous bacteriophage.

**SOLUTION:** This gene expression library containing all of cDNA clones at a same ratio and useful as a source for finding substances which can become new drugs by a screening with its affinity, etc., is obtained by separating a single chain cDNA and a double chain cDNA in a cDNA clone containing a protein translation region as a uniforming manipulation, then amplifying the single chain cDNA by a polymerase chain reaction (PCR method) using a lone linker, performing the degeneration and reassociation of the double chain cDNA and introducing the obtained DNA by substituting for or inserting into the part of the coat protein gene of a filamentous bacteriophage for the preparasion the library.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

29.03.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Best Available Copy

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-23885

(43) 公開日 平成9年(1997)1月28日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 39/395			A 6 1 K 39/395	B
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
// C 1 2 P 21/02			C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 Q 1/68		9453-4B	C 1 2 Q 1/68	A
審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 6 頁)				

(21) 出願番号 特願平7-176103

(22) 出願日 平成7年(1995)7月12日

(71) 出願人 000002831

第一製薬株式会社

東京都中央区日本橋3丁目14番10号

(72) 発明者 藤原 弘之

東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内

(72) 発明者 中筋 公吉

東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内

(72) 発明者 佐藤 嘉生

東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内

(54) 【発明の名称】 遺伝子発現ライブラリー及びその製造法

(57) 【要約】

【課題】 未知の蛋白質を見出す物質起源として、すべてのcDNAクローンが同じ割合で含まれる発現ライブラリーを提供する。このライブラリーより医薬として利用できる物質を選択する。

【解決手段】 蛋白質の翻訳領域を含んだ均一化したモジュール構造含有ライブラリーをフィラメンタスファージなどで構築し、発現した蛋白質をバイオパニングや酵母の2ハイブリッド・システムで所望のクローンを選択する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 すべての cDNA クローンが同じ割合で含まれる発現ライブラリー

【請求項2】 すべての cDNA クローンが同じ割合で含まれる発現ライブラリーが構築可能な制限酵素切断部位が DNA 両端についている DNA

【請求項3】 ファージによって製造された請求項1記載の発現ライブラリー

【請求項4】 ファージがフィラメントスファージである請求項3記載の発現ライブラリー

【請求項5】 蛋白質の翻訳領域を含む cDNA クローンに均一化操作を行い、得られた DNA を、フィラメントスファージのコート蛋白質遺伝子の一部と置き換え又は挿入により導入しライブラリーを構築する、すべての cDNA クローンが同じ割合で含まれる発現ライブラリーの製造法

【請求項6】 均一化操作をローン・リンカーを用いた均一化サイクル処理により行う、請求項5記載のすべての cDNA クローンが同じ割合で含まれる発現ライブラリーの製造法

【請求項7】 すべての cDNA クローンが同じ割合で含まれる発現ライブラリーよりある蛋白質との親和性により、その蛋白質と親和性の高い蛋白質を選択する方法

【請求項8】 ある蛋白質が抗体であり、所望の抗原を親和性により選択する請求項7記載の方法

【請求項9】 ある蛋白質との親和性により選択する方法が、酵母の 2 ハイブリッド・システムである請求項7又は請求項8記載の方法

【請求項10】 すべての cDNA クローンが同じ割合で含まれる発現ライブラリーより、請求項7、請求項8または請求項9に記載の方法で得られた遺伝子産物

【請求項11】 すべての cDNA クローンが同じ割合で含まれる発現ライブラリーより得られる遺伝子産物からなる医薬

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、遺伝子ライブラリーに関し、特に様々な確率で存在するメッセンジャー RNA (mRNA) の割合を均一化した相補的 DNA (cDNA) がファージベクター表面に融合蛋白質ないし単一蛋白質として発現する発現ライブラリーに関する。

## 【0002】

【従来の技術】遺伝子ライブラリーに関しては、種々の作製技術が知られている。更に、構造遺伝子をコードしている遺伝子を対象として、発現している mRNA を相補的に DNA 化する逆転写酵素などで cDNA を作製し、カタログ化を図ることはやられている。ライブラリー化に関しても、ライブラリーよりクローンを選択する手段の対象が DNA、RNA または発現蛋白質により、それぞれベクターが選択されている。

【0003】 mRNA の割合を均一化しライブラリー化しようという試みも、近年行われている。例えば、Minoru S.H. Ko はマウス線維芽様細胞 Ltk<sup>+</sup>細胞から mRNA を得、cDNA 化後、均一化サイクルと呼ばれる、一本鎖 cDNA と二本鎖 cDNA の分離さらに一本鎖 cDNA の PCR 法により、二本鎖 cDNA の変性・再会合を行うことで細胞の mRNA のサブトラクション (重複している mRNA 分子を差し引くこと) 処理を行うことで cDNA 均一化ライブラリー DNA を得、ローン・リンカーを用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR 法) により増幅を行い、プラスミドベクターへ導入しライブラリーを構築している。(Nucleic Acids Res., 18 p570 5-5711, 1990)

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】未知の蛋白質を見つける方法として、まず発現している mRNA をすべてカタログ化した cDNA ライブラリーをその見つける物質起源として、更に、発現している蛋白質の機能面を調べられるスクリーニングにかけられるものとして構築し、これより種々のスクリーニング法、特に in vivo での蛋白質などとの相互作用を見ることにより、医薬として利用できる物質を選び出せるものはなかった。

【0005】先に述べた、Minoru S.H. Ko のライブラリーでは、mRNA の重複を防ぐ点から、3' 側に限定した cDNA が含まれており、構造遺伝子の部分がすべて含まれているわけではなく、発現蛋白質を in vivo に近い状態でスクリーニングすることはできない。

【0006】本発明は、in vivo での蛋白質などとの相互作用を見ることが可能な、つまり自然に近い状態でスクリーニングが可能で、更に、スクリーニングしやすかつすべてのスクリーニング対象が並べられている発現 cDNA 均一化ライブラリーを提供することにある。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】未知の蛋白質を見つける方法は、次のような手段が考えられている。

【0008】(1) ある生理機能を反映するスクリーニング法を用いて、考えられる物質起源のものを選び、その生理機能に影響を及ぼす物質を精製し、最終的に単離する方法。(2) ある物質 (レセプター、リガンド、酵素及び抗体等) に親和性を示すものを生化学的・物理化学的手段を用いて特定していく方法。(3) 既知の蛋白質のアミノ酸やそれをコードする遺伝子配列のホモロジーを利用して、その蛋白質に近縁なファミリーを決定していく方法。

【0009】本発明は、このうちとりわけ (2) のスクリーニングを行う上で有力な、スクリーニング対象となり得るライブラリーを提供することにある。更に、単なる物質の集団ではなく、すべてのスクリーニング対象が並べられている発現 cDNA 均一化ライブラリーを提供することにある。

【0010】蛋白質をコードする動物個体の遺伝子は、5～10万種類あるといわれており、そのmRNAは様々な確率で存在することが知られている。例えば、細胞骨格系を形成するアクチン遺伝子のmRNAはほとんどの細胞において構成的発現により比較的大量にいつでも存在している。更に、常時大量に必要とするアルブミン等の蛋白質生産を担当する細胞では、それぞれのmRNAを数多く重複している。一方、生体の生理機能は、ホメオスタシスを維持する因子の相互作用により調節されており、その因子のいくつかは、そのコードするmRNAが極めて微量でかつ誘導されなければ存在し得ないものもある。

【0011】今まで作られた多くのcDNAライブラリーは、mRNA起源となる細胞のmRNAの量比を反映しているか、目的とする蛋白質、つまりmRNAの分子数を増やすため誘導がかかる処理を施した細胞から作られたものであった。

【0012】これらの多くのcDNAライブラリーでは、ある遺伝子をクローニングするのに存在確率の差により、機能が明らかでも特定が難しかったり、目的ものの誘導の差によりスクリーニングの規模が決まってしまうという欠点があった。

【0013】この欠点を、克服するため、先に述べたMinoru S.H.Koの均一化cDNAライブラリーが作られている。この均一化cDNAライブラリーは、その目的として、生物個体で発現している遺伝子のカタログ化することによる遺伝子単離方法の劇的な単純化と、低い確率でしか存在しない遺伝子（例えば、数コピー／細胞のmRNA）の単離手段を提供することであった。

【0014】しかし、このライブラリーは、mRNAの重複を均一化サイクル処理（PCR法と二本鎖cDNAの変性・再会合を行うことでmRNAのサブトラクションを行う。）で除くため、遺伝子でもその特長がはっきりしている3'側の配列、つまり構造遺伝子が含まれない非翻訳領域のcDNA配列で構築されている。一度このライブラリーで目的の遺伝子をクローニングでも、再度、構造遺伝子を含む遺伝子ライブラリーを釣り上げたクローンでスクリーニングし、完全長のものでなくてはならない。更に、構造遺伝子部分の蛋白質をスクリーニングの対象とすることはできなかった。

【0015】蛋白質との親和性を指標として目的物質をスクリーニングするため、構造遺伝子部分を含むcDNAを発現させなくてはならない。しかも、均一化ライブラリーを発現させるためには、従来のような特定遺伝子の効率的な発現を目的としたベクターでは発現の偏りができると考えられ不適当である。

【0016】多種類の遺伝子を均一に発現できる系としてG.S.Smithが報告している、フィラメンタスファージによる蛋白質発現系が挙げられる。（Science, 228 p1315-1317, 1985）

この系は、フィラメンタスファージのマイナー・コート蛋白質の一部であるpIII蛋白質領域に他の遺伝子を挿入して融合蛋白質として発現させるものである。この融合蛋白質は、pIII蛋白質の機能である大腸菌への感染開始能が保たれているばかりでなく、ファージ体表に発現され、その蛋白質固有の結合能（親和性）を保持していることが示された。（S.F.Parmley and G.P.Smith, Gene, 73p305-318）

更に、この優れた性質を活かし、ランダムなアミノ酸配列をコードする合成DNA混合物を挿入することで、J.K.Scott and G.P.Smithはランダムペプチドライブラリーを作製している。（Science, 249 p386-390, 1990）

本発明の均一化発現cDNAライブラリーには、構造遺伝子部分を挿入したフィラメンタスファージによる蛋白質発現系が用いることができる。このファージには、抗体遺伝子の発現例（J.D.Marksら, J.Mol.Biol., 222 p581-597, 1991）で示されるように800～1,000塩基長の遺伝子が挿入可能である。

【0017】800～1,000塩基長は、アミノ酸をコードする数にして約270～330にあたる。ヒトや動物での全遺伝子の種類は5万種前後と考えられ、mRNAの長さは1,000～2,000塩基長以上のものが数多く存在している。つまり、フィラメンタスファージに構造遺伝子そのまま挿入するのは不可能と考えられる。

【0018】しかし、蛋白質の相互作用を検索するには、ある構造遺伝子そのままの構造が必要であるわけではない。M.Golは、蛋白質の機能の系統的な進化を解明するために蛋白質の機能単位として物理化学的計算により割り出すことができるモジュールと呼ばれる構造を想定している。そして、このモジュールの組み合わせにより特異な親和性が現れることを示している。（郷通子、蛋白質・核酸・酵素 39p2449-2456, 1994）

つまり、親和性を示す蛋白質部分、例えばモジュールを含むものであれば蛋白質の相互作用を検索可能である。

【0019】水溶性蛋白質は一般に球状のドメインが繋がってできている。球状ドメインは普通50～200アミノ酸残基程度の固まりであるが、例外として300残基以上の大きなものも知られている。球状ドメインはモジュールが組み合わさったものである。モジュールは連続した10～40残基前後のアミノ酸残基からできるコンパクトな構造ユニットである。（郷通子、分子進化実験法、第18章、日本生化学会編集、東京化学同人発行、1993）

モジュールは親和性を検索する対象として考えられるので、そのアミノ酸からコードされるDNAの長さは30～120塩基長となる。先に述べたフィラメンタスファージの発現系では800～1,000塩基長が挿入可能なので、約7～33のモジュール構造を発現できる。

【0020】 mRNAの長さを考慮すると、均一化したcDNAを対象とすると、構造遺伝子部分を含むものを、そのオープンリーディングフレームの上流・中流・下流に相当するcDNA断片としてライブラリー化することで親和性検索ライブラリーとして利用できる。更に、蛋白質をコードする動物固体の遺伝子は、5~10万種類といわれているので、均一化ライブラリーとしてファージ $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ をスクリーニングすれば良いこととなる。このスクリーニングの数は、付番等によるカタログ化の可能な数字である。

【0021】つまり、均一化したcDNAよりなる、構造遺伝子部分を含むライブラリーは、その中に含まれるモジュール構造による親和性によるスクリーニングが可能である。

【0022】このライブラリーのスクリーニングには、特定の蛋白質をコートしたプレートを用いて、特異的に結合するファージをパニング法等により選別することができる。コートする蛋白質としては、特に制限はないが、特定の組織、細胞、更に、レセプターと生理現象に関与していると考えられるものが好ましい。親和性を確認後、選択されたファージの挿入cDNA断片の塩基配列を決め、既知のものとは異なるものであれば、新規な生理活性に関与する因子等が見つけれられる。

【0023】また、見つけれられた因子を発現させ、その親和性を阻害したり、影響を与えることが分かる実験系を組めることから、阻害剤等のスクリーニング系が作製可能となる。

【0024】親和性を示すものが、抗体と抗原の関係となっていればどちらかが分かれば、スクリーニングで得ることが可能である。得られた親和性の分析には、モジュール構造を介して行える。これは、より早い分析手段の材料を提供するものである。

【0025】親和性を調べるよりin vivoに近い系として、酵母のtwo-hybrid system (2ハイブリッド・システム)が開発された。これは2種の融合蛋白質間(two-hybrid)の相互作用(結合活性)を、酵母細胞内転写の活性化を指標に検出する実験系である。(Fields, S. and Song, O., Nature, 340 p245-246, 1989)

2ハイブリッド・システムでは、酵母の発現ベクター上に転写因子SRFまたはGAL4の結合領域に目的の蛋白質を融合させた形で遺伝子を構築し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子(LacZ)をレポーター遺伝子として持った指示酵母株(62L)に導入する。一方、cDNAライブラリー、本発明では均一化発現ライブラリーが構築可能な、制限酵素切断部位が両端についているDNAを酵母発現ベクター上で転写のアクチベーターであるVP16 (またはGAL4)のアクチベータードメインの下流に構築し、同様に導入する。ナイロンメンブレン上にコロニーを形成させ、ガラクトース培地により両プラスミドからの発現を誘導させた後、X-galを基質に

し、コロニーの青色を指標にスクリーニングする。レポーター遺伝子としては、酵母遺伝子HIS3を用いたものも知られている。

【0026】

【発明の構成】すなわち本発明は、すべてのcDNAクローンが同じ割合で含まれる発現ライブラリーに関する。

【0027】更に、すべてのcDNAクローンが同じ割合で含まれる発現ライブラリーが構築可能な、制限酵素切断部位がDNA両端についているDNAに関し、ここで言う制限酵素切断部位は、特に制限はないが、好ましくは、発現ベクターに挿入可能な制限酵素部位が望ましい。また、マルチ・クローニング部位として両端または一方端につけてあっても良い。

【0028】また、すべてのcDNAクローンが同じ割合で含まれる発現ライブラリーが、ファージによって製造されたものに関し、そのファージは挿入遺伝子が発現可能なファージであればよく、好ましくは、ラムダファージやフィラメントスファージが挙げられる。

【0029】更に、すべてのcDNAクローンが同じ割合で含まれる発現ライブラリーが、フィラメントスファージによって製造されたものである発現ライブラリーに関する。

【0030】本発明は、蛋白質の翻訳領域を含むcDNAクローンに均一化操作を行い、得られたDNAを、フィラメントスファージのマイナー・コート蛋白質遺伝子の一部と置き換え又は挿入により導入しライブラリーを構築する、すべてのcDNAクローンが同じ割合で含まれる発現ライブラリーの製造法に関する。更に、蛋白質の翻訳領域を含むcDNAクローンに均一化操作をローン・リンカーを用いた均一化サイクル処理により行い、得られたDNAを、フィラメントスファージのコート蛋白質遺伝子の一部と置き換え又は挿入により導入することによりライブラリーを構築する、すべてのcDNAクローンが同じ割合で含まれる発現ライブラリーの製造法に関する。

【0031】ローン・リンカーを用いた均一化サイクル処理とは、Ko, M. S. H. らが述べているcDNAのセルフ・サブトラクションを相補的DNAまたはRNA同士がハイブリッドを形成するという現象を利用して、キネティクスを考慮した条件で行い、cDNAの均一化を図り、このセルフ・サブトラクション後のDNA量の減少を回復するために、ローン・リンカーと呼ばれる非接着性の突出末端と平滑末端を持ったリンカー配列を用いた、アンカードPCR法でcDNAを集団として増幅することを言う。(Ko, M. S. H. ら, Nucleic Acids Res., 18 p4293-4294, 1990)

更に、すべてのcDNAクローンが同じ割合で含まれている発現ライブラリーよりある蛋白質との親和性により、その蛋白質と親和性の高い蛋白質を選択する方法に

関する。

【0032】親和性のスクリーニングは、ベクターをフィラメントファージを選べば、発現後、ある蛋白質に親和性があるものを捜す目的のスクリーニングとして、特定の蛋白質をコートしたプレートを用いて、特異的に結合するファージをパニング法等で選別することが可能であり、酵母の2ハイブリッド・システムを用いればより *in vivo* を反映したスクリーニングが可能となる。

【0033】また、親和性のスクリーニングで、ある蛋白質が抗体であり、所望の抗原を親和性により選択する方法に関する。

【0034】更に、ある蛋白質との親和性により選択する方法が、酵母の2ハイブリッド・システムである親和性スクリーニング方法に関する。

【0035】本発明は、すべてのcDNAクローンが同じ割合で含まれる発現ライブラリーより親和性のスクリーニング方法で得られた遺伝子産物に関し、この遺伝子産物は、完全な構造遺伝子を得るためのプローブとなり、また、モジュール単位の3次元構造解析などで親和性が検討できる材料となりえる。目標とする組織、細胞、レセプター、あるいは種々の因子に対し、親和性の高いものから低いものへと種々の蛋白質の品揃えが見つければ、新たな生理活性を見つけられる可能性があり、しかもその分子生物学的な説明が早くできるような材料を提供することができる。

【0036】更に、すべてのcDNAクローンが同じ割合で含まれる発現ライブラリーより得られる遺伝子産物からなる医薬に関する。

【0037】親和性だけに着目しても、レセプターのアゴニストやアンタゴニストが簡単にしかも重要な親和性に寄与しているモジュール構造のみで取り出せる可能性があり、今まで知られていない医薬品となる可能性がある。

【0038】均一化発現cDNAライブラリーのそれぞれのクローンを付番(タグ)によりカタログ化することができ、 $1 \times 10^5 \sim 10^6$  の個々のクローンを色々なアッセイ系にかけ機能を明らかにしたクローンとしてデータベース化できる。将来、調節蛋白質の組み合わせまたは改変で、より緩やかな調節とか、機能を組み合わせることにより、全く知られていなかった医薬品の開発に応用できる蛋白質起源を提供できることとなる。

【0039】cDNA化するmRNAの起源は特に制限はないが、医薬を目的とする考えから、ヒト由来の細胞、臓器が好ましい。細胞や臓器等からmRNAを抽出する方法は一般的に知られており、例えば、塩酸グアニジン法、リチウムクロライド法が挙げられる。ポリ(A)+RNAの分離についても一般に知られており、オリゴdTカラム法などで行えばよい。

【0040】得られたポリ(A)+RNAは、ポリA鎖から合成すれば良い。例えば、オリゴdT-N<sub>6</sub>ntIブ

ライマー(5'-AATTCGCGGCCGCTTTT TTTT TTTT TTTT-3')を用い逆転写酵素で2本鎖cDNAとする。この時、合成条件を選べば200塩基対から数Kbの塩基対のcDNAが合成できる。得られたcDNAをアガロースゲル電気泳動などで所望の塩基対の集団となるようにサイズ分画を行う。分画後、エリューション、エタノール沈殿などで回収し、cDNA両端をT4DNAポリメラーゼ処理で両端をそろえる。

【0041】得られたcDNAにローン・リンカーをライゲースを用いて接続する。ローン・リンカーとしては、例えばLL-SaIIとして、LL-SaIIA(5'-ATTGACGTCGACTATCCAGG-3')及びLL-SaIIB(5'-CCTGGATAGTCGACGTC-3')を用いることができる。

(Ko, M.S.H.ら, Nucleic Acids Res., 18, p4293-4294, 1990)

LL-SaIIA, Bをリン酸化し、アニーリングさせる。このアニーリングしたLL-SaIIをプラント末端としたcDNAとT4DNAライゲースを用い接続させる。

【0042】得られたcDNA-ローン・リンカー産物をPCR法により増幅する。増幅したcDNA-ローン・リンカー産物を変性、再会合処理により、ハイブリッドを形成させる。ハイブリッドを形成しない1本鎖のみをハイドロキシアパタイトカラム(65℃保温)で回収する。

【0043】1本鎖cDNAをPCR法により、増幅を行ない2本鎖cDNAとする。

【0044】変性、再会合処理の時、構造遺伝子の下流域cDNAを加えることで、構造遺伝子の中流・上流域が1本鎖として得られ、また、構造遺伝子の中流と下流域cDNAを加えることで構造遺伝子の上流域が1本鎖として得られる。

【0045】それぞれの1本鎖集団をPCR法で増幅することにより、蛋白質モジュール・ライブラリーとして、構造遺伝子上流、中流及び下流の各ライブラリーを構築できるcDNA集団が得られる。

【0046】所望のcDNA集団が得られたならば、親和性を検索するベクターへの挿入などを考慮し、各種リンカーを用意し結合すればよい。

【0047】

【発明の効果】構築されたすべてのcDNAクローンが同じ割合で含まれる発現ライブラリーは、新規な医薬となり得る物質を親和性などでスクリーニングし得られる物質起源となる。また、親和性を基礎とした生理現象説明の材料を提供できる。

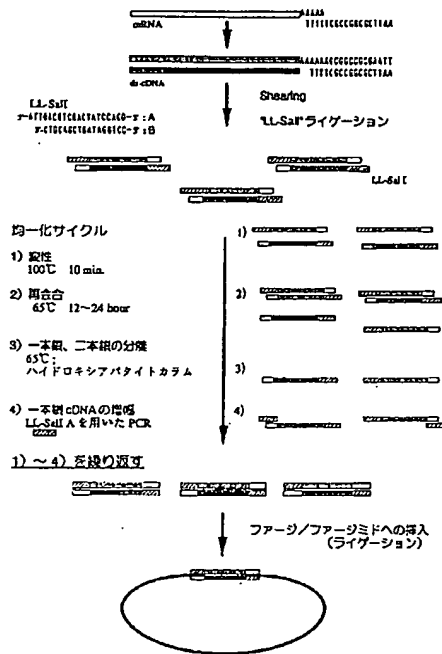
【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、均一化cDNA発現ライブラリーの作製手順を示したものである。

【図2】 図2は、均一化cDNA発現ライブラリーの利 用の例を示したものである。

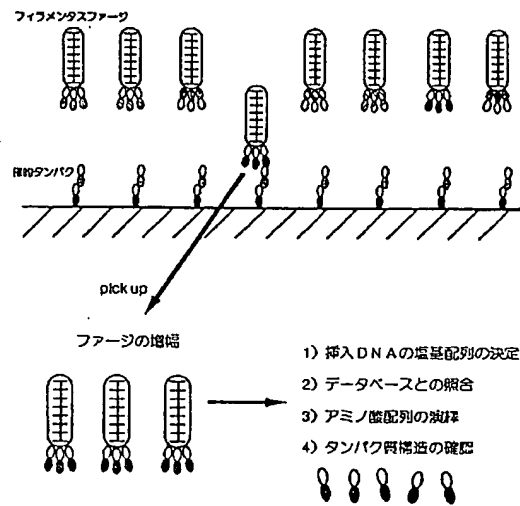
【図1】

## 均一化cDNAライブラリーの作製



【図2】

## 均一化cDNA発現ライブラリーの利用



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**